

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour
le classement et les
commandes de reproduction).

2.198.642

(21) N° d'enregistrement national :
(A utiliser pour les paiements d'annuités,
les demandes de copies officielles et toutes
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

72.31557

BREVET D'INVENTION

PREMIÈRE ET UNIQUE
PUBLICATION

(22) Date de dépôt 6 septembre 1972, à 15 h 9 mn.
Date de la décision de délivrance..... 18 mars 1974.
(47) Publication de la délivrance..... B.O.P.I. — «Listes» n. 13 du 29-3-1974.

(51) Classification internationale (Int. Cl.) G 01 n 31/00.

(71) Déposant : VOGEL Charles Philippe et LARTILLOT Serge, résidant en France.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Boettcher.

(54) Procédé de dosage de l'acide urique dans les liquides biologiques et jeu de réactifs pour ce dosage.

(72) Invention de :

(33) (32) (31) Priorité conventionnelle :

L'invention a pour objet un procédé et un jeu de réactifs pour le dosage de l'acide urique dans des liquides biologiques principalement, mais non exclusivement, le sang.

On sait déjà doser l'acide urique dans le sang en utilisant une première enzyme, l'uricase, qui oxyde spécifiquement l'acide urique puis une seconde enzyme, la catalase qui favorise la transformation en aldéhyde formique du méthanol provenant de la première réaction. Ensuite, on procède au dosage de l'aldéhyde formique. Ceci se fait de différentes façons dont l'une consiste à utiliser la réaction de HANTZCH. Celle-ci nécessite une quantité de sérum de deux fois 0,2 ml et demande une durée de 70 mn.

D'autre part, les réactifs classiques que l'on emploie ne se conservent pas facilement; il est donc habituel de les préparer au moment de s'en servir.

Le but principal de l'invention est d'apporter un procédé de dosage de l'acide urique dans les liquides biologiques fourni, après la dernière réaction, une solution finale aqueuse colorée dont la densité optique est facilement mesurable par colorimétrie.

Un autre but important de l'invention est d'apporter des réactifs choisis et conditionnés de façon telle qu'ils se conservent pendant de longues périodes sans précautions rigoureuses.

On atteint ces buts, selon l'invention, de la manière que l'on va décrire maintenant.

En appliquant le procédé de l'invention, on met simultanément en présence le liquide soumis au dosage et une solution contenant de l'uricase et de la catalase en quantités définies, du méthanol exempt d'aldéhydes, en présence d'une solution tampon de pH 8.

L'uricase oxyde spécifiquement l'acide urique et donne de l'allantoïne, du gaz carbonique et de l'eau oxygénée. Celle dernière, en présence de la catalase, oxyde le méthanol en donnant du formaldéhyde et de l'eau.

Ces réactions étant terminées, on ajoute une solution définie d'hydrazone de la 3-méthylbenzothiazoline-2-one, en abrégé HMBT, dans une solution tampon de pH 3 \pm 0,05. Le formaldéhyde est alors condensé avec la HMBT.

On ajoute ensuite une solution de chlorure ferrique dans

l'acide chlorhydrique. Il en résulte qu le dérivé obtenu par la réaction précédente est oxydé par les ions ferriques et donne un colorant bleu.

Le pH de ces deux réactions a une importance fondamentale 5 pour la spécificité du dosage.

Avec un appareil classique de colorimétrie tel qu'un spectrophotomètre ou un photocalorimètre à filtre, on évalue l'intensité de cette couleur en la comparant à celle d'une solution étalon à teneur initiale connue en acide urique que 10 l'on traite comme ci-dessus ou à une courbe de référence établie à partir de dilutions appropriées dans l'eau distillée de la solution étalon. Le procédé que l'on vient de décrire est mis en oeuvre, avantageusement, avec les réactifs suivants dont on indique ci-dessous la composition.

15 Réactif 1 :

On mélange dans l'ordre indiqué :

- Méthanol exempt d'aldéhydes 0,4 ml
- Solution tampon tris 0,2 M pH 8 19,6 ml
- Catalase (exempte d'uricase) 90.000 UI (unités internationales)
- 20 - Uricase 2,5 UI ou 420 unités Praetorius.
- eau distillée, quantité suffisante pour 25 ml

Réactif 2 :

Même composition que ci-dessus mais absence d'uricase.

25 Réactif 3 :

- HMBT, chlorhydrate 0,2 g pour 100 ml d'une solution tampon glycocolle-acide chlorhydrique 0,5 M pH 3 \pm 0,05.

Réactif 4 :

- chlorure ferrique ($Cl_3Fe \cdot 6H_2O$) 0,8 g pour 100 ml d'une 30 solution d'acide chlorhydrique 0,01 N.

Le réactif 4 est stable indéfiniment à la température ordinaire.

Le réactif 3 est stable jusqu'à une durée d'un an quand il est conservé à +4°C.

35 Les réactifs 1 et 2 sont stables pendant deux semaines seulement environ, quand ils sont conservés à +4°C.

Afin d'éliminer cet inconvénient, il est prévu selon l'invention de soumettre les réactifs 1 et 2 à un traitement de lyophilisation et de les livrer aux utilisateurs à l'état solid ,

n ampoules ou n flacons scellés. Ainsi, à +4°C leur durée de conservation est à peu près infini. Au moment de l'emploi, on dissout le produit solide dans une quantité appropriée d'une solution de méthanol à 2 % et on obtient le réactif en solution pouvant encore être conservé pendant deux semaines à +4°C.

La composition des réactifs 1 et 2 déterminée par l'invention rend possible leur présentation finale sous une forme sèche se conservant aisément après un unique traitement de lyophilisation. De plus, chacun d'eux constitue un unique produit facile à mettre en solution et donnant rapidement un réactif liquide complet à composition strictement déterminée et équilibrée.

Un autre avantage appréciable de l'invention découle de l'usage du réactif 3 qui permet d'obtenir un milieu réactionnel final limpide.

15 Pour obtenir une solution étalon d'acide urique on dissout 50 mg d'acide urique et 50 mg de benzoate de sodium dans 100 ml de tampon borate 0,2 M pH 8,5.

On peut tracer une courbe de référence en traitant comme dit plus haut des dilutions appropriées dans de l'eau distillée de 20 cette solution étalon.

Cette courbe doit être linéaire jusqu'à une concentration approximative en acide urique de 100 mg/l au moins. S'il n'en est pas ainsi, il y a lieu de penser que les enzymes du réactif 1 en particulier de l'uricase, ont une activité insuffisante.

25 Il est préférable à ce sujet d'utiliser de l'uricase ayant une activité spécifique de 0,1 UI/mg au moins et pour la catalyse de 4000 UI/mg au moins.

Pour éliminer les erreurs dues à la coloration provenant d'30 causes parasites autres que l'acide urique, on traite à la fois une fraction du liquide à doser avec le réactif n° 1 et une fraction appelée témoin avec le réactif n° 2 dépourvu d'uricase. Le processus opératoire est le suivant :

Dans des tubes à hémolyse, on introduit des solutions de la façon suivante :

| 35 | TUBE 1 (liquide à doser) | TUBE 2 (témoin) |
|-----------------|-----------------------------|--------------------|
| liquide à doser | 0,05 ml | |
| liquide étalon | | 0,05 ml |
| réactif 1 | 0,25 ml | |
| réactif 2 | | 0,25 ml |

On agit, on chauffe au bain-marie à 37°C t après 10 minutes, on ajoute :

Réactif 3 0,4 ml 0,4 ml

On agite, on laisse séjourner à 37°C pendant cinq minutes ,
5 dans les tubes où le liquide à doser n'est pas du sérum on
introduit 0,05 ml d'un sérum normal parfaitement limpide, on
agit et aussitôt après, on ajoute :

Réactif 4 0,4 ml 0,4 ml

On agite, on laisse séjourner à 37°C pendant 10 minutes,
10 on retire du bain-marie et on ajoute

Eau distillée 2 ml 2 ml

On agite et on mesure la densité optique de la coloration de chaque tube à une longueur d'onde de 630 nm. On évalue la concentration en acide urique du liquide soumis au dosage en se reportant à une courbe d'étalonnage établie à partir de dilutions appropriées dans l'eau distillée de la solution étalon décrite plus haut. Par exemple, pour une concentration de 50mg/l d'acide urique dans le sérum, la densité optique de la solution finale ayant un volume de 3 ml est de l'ordre de 0,25 pour un trajet optique de 1 cm.

Les corps entrant dans la composition des réactifs doivent être aussi purs que possible, de la qualité pour analyses, par exemple de la société américaine MERCK.

Les proportions relatives indiquées sont celles qui sont préférables; bien entendu, elles pourraient être modifiées dans certaines limites. Il pourrait en résulter un changement des temps de réaction. Par exemple, une plus faible teneur en uricase entraînerait un accroissement du temps de réaction de celle-ci.

On notera que le procédé de l'invention ne demande que
30 deux fois 0,05 ml de sérum et que sa mise en oeuvre ne dure que
20 mn. Il a donc l'avantage d'être particulièrement sensible,
rapide, applicable aux liquides biologiques et permettant une
évaluation photométrique dans le spectre visible. De plus, sa
mise en oeuvre se fait au moyen de réactifs pouvant être conser-
35 vés longuement.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de dosag d l'acide uriqu dans les liquids organiques faisant intervenir l'uricase et la catalase, caractérisé en ce qu'on met simultanément en présence le liquide soumis au dosage et une solution contenant à la fois de l'uricase et de la catalase, du méthanol exempt d'aldéhydes, en présence d'une solution tampon de pH 8, puis on ajoute une solution définie d'hydrazone de la 3-méthylbenzothiazoline-2-one dans un solution tampon de pH $3 \pm 0,05$, ensuite on ajoute une solution de chlorure ferrique dans l'acide chlorhydrique et on obtient une solution aqueuse colorée, on évalue l'intensité de la coloration et on en déduit la teneur en acide urique par comparaison à une solution étalon d'acide urique ou à une courbe de référence.

5 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on effectue les réactions à une température de 37°C, en agitant et en laissant reposer pendant 5 à 10 minutes après chaque adjonction.

10 20 3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu', lorsque le liquide soumis au dosage n'est pas du sérum, on ajoute du sérum normal parfaitement limpide juste avant la solution de chlorure ferrique.

15 25 4. Jeu de réactifs pour l'application du procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend :

- un premier réactif ayant la composition suivante :
 - méthanol exempt d'aldéhydes 0,4 ml
 - solution tampon tris 0,2 M pH 8 19,6 ml
 - catalase 90.000 unités internationales
- uricase 2,5 UI ou 420 unités Praetorius.

30 35 - eau distillée, quantité suffisante pour 25 ml

- un second réactif ayant la même composition que le premier à l'exception de l'uricase.
- un troisième réactif ayant la composition suivante :
 - hydrazone de la 3-méthylbenzothiazoline-2-one, 0,2g pour 100 ml d'une solution tampon glycocolle-acide chlorhydrique 0,5 M pH $3 \pm 0,05$.
 - un quatrième réactif ayant la composition suivant :

- chlorure ferrique 0,8 g pour 100 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,01 N.

5. Jeu de réactifs selon la revendication 4, caractérisé en ce que le premier et le second réactifs sont chacun une poudre sèche obtenue après un traitement de lyophilisation et conservée en récipient scellé, susceptible d'être dissoute au moment de l'emploi dans une quantité appropriée d'une solution de méthanol.

THIS PAGE BLANK (USPTO)